Über die regulatorische Wirkung von Adenosin-3', 5'-monophosphat im Glukosestoffwechsel von Schnitten, zellfreien Überständen und Suspensionen von Kaninchenhirngewebe

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Eberhard Wilmes

Saarbrücken

1973

1974

Aus der Neurochirurgischen Klinik der Universität
des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. med. Friedrich Loew

Über die regulatorische Wirkung von Adenosin-3', 5'-monophosphat im Glukosestoffwechsel von Schnitten, zellfreien Überständen und Suspensionen von Kaninchenhirngewebe

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
1973

vorgelegt von
Eberhard Wilmes
geb. am 17.12.1946 in Siegen

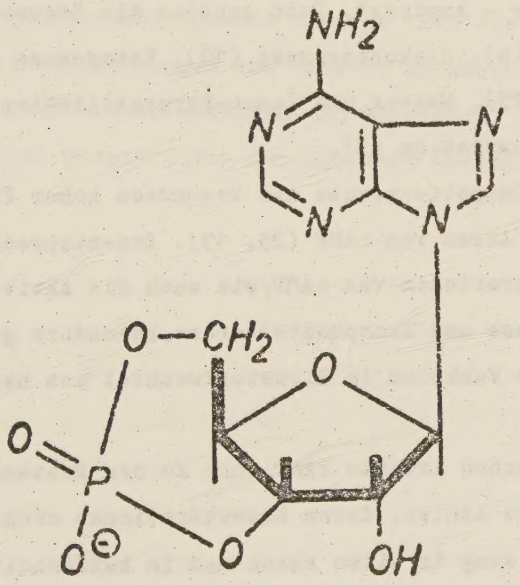
Dekan: Prof. Dr. med. G.A. Jutzler
Referent: Prof. Dr. med. F. Loew

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mündlicher Prüfungstermin : 12. Februar 1974

1. EINLEITUNG

Das Adenosin-3',5'-monophosphat (zyklisches AMP bzw. cAMP) ist ein Nucleotid. Es ist aufgebaut aus der Base Adenin, dem Zucker Ribose und Phosphorsäure, die an die -OH Gruppen der Ribose in 3' und 5' Stellung gebunden ist (Abb. 1):



Adenosin-3',5'-monophosphat

Die regulatorische Wirkung von cAMP ist für viele biochemische Reaktionen nachgewiesen. Hormone beeinflussen die Konzentration von cAMP in peripheren Geweben. Man spricht von einem two-messenger system, in dem Hormone den first messenger und cAMP den second messenger darstellen (7). Zu diesen Hormonen gehören die Katecholamine (24), Glukagon (25), ACTH (13), ICSH (18), Vasopressin (5), TSH (11), Insulin (8) und Acetylcholin (21). Durch den selben Effekt, nämlich eine Änderung der intrazellulären Konzentration des second messenger, werden in verschiedenen Zellgeweben verschiedene biochemische Reaktionen - bedingt durch ihre unterschiedlichen Enzymmuster - angeregt. Dazu gehören die Steroidgenese (13), Lipolyse (6), Glukoneogenese (10), Ketogenese (2), Glykogenolyse (25), Wasser und Ionen-Permeabilitäten (22) und die Glukoseoxydation (3).

Gehirn ist das Säugetiergewebe mit besonders hoher Fähigkeit zu Synthese und Abbau von cAMP (23, 15). Dementsprechend sind die Konzentrationen von cAMP, wie auch die Aktivitäten von Adenyl-Cyclase und Phosphodiesterase, besonders gross. Die regulierende Funktion im Hirnstoffwechsel ist nachgewiesen (20, 26).

Nach neuen Versuchen ist das cAMP auch zu den Bestandteilen von Hirngewebe zu zählen, deren Konzentrationen sich bei elektrischer Reizung in vitro rasch und in beträchtlichem Umfang erhöhen (14).

Im Labor der Homburger Neurochirurgischen Universitätsklinik läuft ein Versuchsprogramm über Hirnödeme des Kaninchens,

wobei hauptsächlich folgende Fragen untersucht werden: Gibt es Unterschiede im Glukosestoffwechsel in normalem und ödematösem Hirngewebe und wie lässt sich dieser beeinflussen? Neben einer größeren Anzahl chemischer Verbindungen wurde aus den obengenannten Gründen auch die Wirkung von cAMP auf den Kaninchenhirnstoffwechsel untersucht. Nach J.Dittmann und H.D.Herrmann wird die aerobe Glukolyse von Kaninchenhirnschnitten durch 0,5mM bzw. 1mM cAMP anfänglich gesteigert und nach ca. 30 min. völlig gehemmt (9).

Ziel dieser Arbeit ist es, durch verschiedenartige Präparationen von Kaninchenhirngewebe Näheres über die Strukturabhängigkeit der Wirkungen von cAMP zu erfahren. Zu diesem Zweck sind Stoffwechselmessungen an Schnitten, zellfreien Überständen und Suspensionen durchgeführt worden.

2. METHODIK

2.1. Herstellung von Schnitten, zellfreien Überständen und Suspensionen

2.1.1. Tiere

Die Versuche werden an ausgewachsenen Kaninchen mit einem Gewicht von 2-3 kg ohne Berücksichtigung von Alter oder Geschlecht durchgeführt. Die Kaninchen werden durch Luftembolie getötet und die Schädelkalotte entfernt. Nach Eröffnen der Dura wird das Gehirn entnommen und in ein Becherglas mit gekühlter Inkubationslösung gegeben. Arachnoidea und Pia werden mitsamt den kortikalen Gefässen sorgfältig entfernt. Beiden Hemisphären werden etwa 15 x 10 mm grosse Hirnareale entnommen und die weisse Substanz weitgehend abpräpariert. Das untersuchte Material enthält stets weitaus überwiegend graue Substanz.

2.1.2. Schnitte

Die Hirnproben werden mit dem Skalpell in Schnitte von maximal 0,3 mm Dicke und 1 mm Kantenlänge zerlegt, wobei die Schnittführung jeweils möglichst senkrecht zur Hirnoberfläche gelegt wird. Geschnitten wird in einer gekühlten Petrischale. Jeder Schnitt kommt sofort in kalte Inkubationslösung, die im Kältebad aufbewahrt wird. Die Inkubationslösung wird hier kurz K-Lösung genannt (wegen ihrer Ähnlichkeit mit Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung) und hat folgende Zusammensetzung:

NaCl	106 mM
KCl	4,6 mM
$CaCl_2$	2,5 mM
$MgSO_4$	0,8 mM
KH_2PO_4	0,3 mM
Na_2HPO_4	1,2 mM
$NaHCO_3$	25 mM
Glukose	2,5 mM

(wenn nicht anders angegeben)

Geschnitten wurde bei allen Versuchen mit etwa der gleichen Geschwindigkeit (Kontrolle nach der Uhr). Die Schnitte werden durch mehrfaches Aufwirbeln und Dekantieren mit kalter K-Lösung gewaschen und mittels Pinzette in vorbereitete Gefässe mit frischer K-Lösung gegeben.

2.1.3. Zellfreie Überstände

Gehirnschnitte werden nach der vorstehend beschriebenen Methode hergestellt und in mehrere Kegelgefässe gefüllt. Diese Gefässe werden im Warburg Apparat (Modell S 85, B.BRAUN Apparatebau, Melsungen) bei 38 Grad Celsius unter leichtem Schütteln mit einem O_2/CO_2 Gemisch (95/5) begast. Nach Schliessen der Gashähne werden die Gefässe weitere 2 1/2 Stunden im Thermostaten gehalten und geschüttelt. Darauf werden diese "Schnittsuspensionen" mit gekrümmter Pipette und Gummisauger möglichst vollständig in graduierte Zentrifugengläser überführt und 10 min. bei ca. 3000·g zentrifu-

giert. Diese Gläser sind mit Schliffstopfen verschliessbar und haben ein Volumen von 3 ml. Der so gewonnene zellfreie Überstand wird abgegossen und zur späteren Verwendung bei -40 Grad C eingefroren. Nach Abtrocknen der Gläserwände wird der Rückstand 16 - 18 Stunden bei 105 Grad C eingedunstet und getrocknet, im Exsikkator über Blaugel abgekühlt und das Gewicht der Trockensubstanz bestimmt.

2.1.4. Suspensionen

Unmittelbar nach Entnahme und Präparation werden die Hirnproben von 1,4 - 1,6 g Frischgewicht mit 48 ml K-Lösung unter Kühlung mit Eiswasser eine Minute im Bühler-Homogenisator bei Höchstgeschwindigkeit zerkleinert. Dabei erwärmen sich die Proben auf maximal 14 Grad C.
Die Hirnsuspension wird aus den gleichen Arealen hergestellt, die sonst für die Anfertigung von Schnitten und zellfreien Überständen verwendet wird.
Trockensubstanzbestimmung: Ein Volumen Suspension und ein gleiches Volumen K-Lösung werden bei 105 Grad C getrocknet und wie oben beschrieben gewägt. Die Differenz der Gewichte ist gleich der in der Suspension enthaltenen Hirntrockensubstanz.

2.2. Manometrie

2.2.1.

Atmung und aerobe Glukolyse (Abbau von Glukose zu Milchsäure in Gegenwart von Sauerstoff) werden nach der neuen manometrischen Zwei-Gefässmethode von Warburg (27,28,29,31,32)

in Gegenwart von HCO_3^- und CO_2 gemessen. Diese Methode wendet folgendes Prinzip an:

Aufnahme von O_2 verursacht Druckabnahme in den manometrischen Systemen. Bildung von CO_2 (durch Atmung und Glukolyse in bibarbonathaltiger Lösung) verursacht Druckzunahme. In einem normalen Reaktionsgefäß ohne besondere Zusätze misst man die Differenz aus Druckabnahme und Druckzunahme. Wenn man in den grossen Anhänger eines Reaktionsgefässes, der nur mit dem Gasraum, nicht mit der Flüssigkeit im Hauptraum verbunden ist, einen genügend konzentrierten Karbonat-Bikarbonat-Puffer geeigneter Zusammensetzung gibt, dann absorbiert dieser Puffer das gebildete CO_2 bis auf einen kleinen Rest. Dieser Rest hängt von Konzentration und Mischungsverhältnis des Puffers ab. Man kann durch geeignete Mischung äquimolarer $KHCO_3$- und K_2CO_3-Lösungen beliebige Gleichgewichtsdrucke von CO_2 zwischen 2% und 10% einer Atmosphäre einstellen und während der Versuchsdauer trotz der Bildung von CO_2 aufrechterhalten. Die Absorption und Hydratisierung des gasförmigen CO_2 wird durch Zugabe von Carboanhydrase beschleunigt.

So erhält man im wesentlichen im Gefäss I eines Gefässpaares die Differenz aus O_2-Aufnahme und CO_2-Bildung, im Gefäss II (Puffer im Anhänger) dagegen die O_2-Aufnahme allein. Man erhält mit den 2 Messwerten 2 Gleichungen mit den 2 Unbekannten, x_{O_2} und x_{CO_2}, und errechnet sie.

Gefässfüllungen:

E r s t e s G e f ä s s

Hauptraum: 2,7 ml Versuchslösung

Birne : 0,3 ml K-Lösung + energiereiches Phosphat

Anhänger : 3,0 ml Wasser

Z w e i t e s G e f ä s s

Hauptraum: 2,7 ml Versuchslösung

Birne : 0,3 ml K-Lösung + energiereiches Phosphat

Anhänger : 2,9 ml Karbonat-Bikarbonat-Puffer

(für 5% CO_2 79/21, v/v;

für 2% CO_2 65/35, v/v)

0,1 ml Wasser mit 2 mg Karboanhydrase (Sigma Chemical Co., St.Louis)

Bei Kontrollgefässen mit leerer Birne werden 3,00 ml K-Lösung in den Hauptraum gegeben.

Die Gefässe werden an den Manometern befestigt, in den Thermostaten gehängt und bei 38 Grad C 10 min unter leichtem Schütteln mit einem N_2-O_2-CO_2-Gemisch durchströmt. Nach Schliessen der Hähne wird die Stoffwechselmessung unter Schütteln (80 bis 90 je min, Amplitude bei Modell S 85:2cm) durchgeführt. Am Ende des Versuchs wird die Versuchslösung jedes Gefässes mit einer kurzen leicht gekrümmten Pipette mittels Gummisauger möglichst vollständig in ein Zentrifugenglas überführt und zur Trockensubstanzbestimmung bzw. zur enzymatischen Substratbestimmung verwendet.

Die manometrischen Versuche wurden zunächst mit einem programmierten Tischrechner (OLIVETTI PROGRAMMA 101) ausgerech-

net (15). Später sind sowohl zahlenmässige Ausrechnung wie graphische Darstellung mit einer elektronischen Rechenanlage (CDC 3150 Control Data Corp.) ausgeführt worden (20).

Begriffe und Symbole

"Aerobe Glukolyse" bedeutet : Unter Sauerstoff gemessene Glukolyse.

"Anaerobe Glukolyse" bedeutet : Unter Stickstoff gemessene Glukolyse

$$Q_{O_2} = \frac{mm^3\ O_2\text{-Aufnahme}}{mg\ Trs.\ und\ Stunde} \quad (Atmung)$$

$$Q_{CO_2} = \frac{mm^3\ CO_2\text{-Bildung}}{mg\ Trs.\ und\ Stunde} \quad (Atmungs- plus\ Glukolyse\text{-}Kohlendioxyd)$$

$$Q_M = \frac{mm^3\ CO_2\ (durch\ H^+\ aus\ HCO_3^-\ freigesetzt)}{mg\ Trs.\ und\ Stunde} \quad (Glukolyse)$$

Unter Annahme eines respiratorischen Quotienten von I kann man Q_M aus Q_{O_2} und Q_{CO_2}, dem Stoffwechselquotienten für die gesamte aerobe CO_2-Bildung, berechnen nach:

$$Q_{CO_2} = Q_M - Q_{O_2}.$$

2.2.2.

Bei Versuchen unter anaeroben Bedingungen (Begasung bei 38 Grad C unter Schütteln 10 min mit einem N_2-O_2-Gemisch (95/5) wird nur CO_2 gebildet und demnach gemessen. Aus der Druckzunahme in den manometrischen Systemen kann man - unter Zuhilfenahme der Gesetze von Boyle-Mariotte, Gay-Lussac und

Bunsen - die CO_2-Bildung berechnen.

2.3. Substrat-Bestimmungen

Alle Substrat-Bestimmungen werden mit Hilfe des optischen Tests nach WARBURG (30) durch Messung von NADH bzw. NADPH durchgeführt. Die Lichtabsorption bei 334 nm (bei der AMP-Bestimmung: 366 nm) wird in 1 cm-Küvetten in einem EPPENDORF-Photometer gemessen (7). Zur Vereinfachung der Glukose-, Laktat- und Pyruvat-Bestimmungen ist für alle Bestimmungen eine gemeinsame Enteiweissung und Neutralisation durchgeführt worden:

1 ml Probe (K-Lsg. aus manometrischem Versuch) wird mit
4 ml 0,165 M $HClO_4$ versetzt und einige Stunden in der Kälte stehen gelassen,
nach Zentrifugieren werden in das gleiche Zentrifugenglas vorsichtig
3 ml 1,1 M K_2HPO_4 gegeben, zugestöpselt und vorsichtig aber gründlich durchgemischt.

Man lässt 14 - 18 Stunden in der Kälte stehen und zentrifugiert 10 min. bei 3000·g. Der klare Überstand ist frei von Eiweiss und Perchlorat und hat einen pH von ca. 7,6. Die Bestimmungen selbst erfolgen in Anlehnung an die Vorschriften von BOEHRINGER, Mannheim (4).

Glukose:

Prinzip des Tests:

$$\text{Glukose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{Glukose-6-phosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{Glukose-6-phosphat} + \text{NADP} \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} \text{6-Phosphoglukonat} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

Durchführung:

2,60 ml 0,3 M Triäthanolaminpuffer, pH 7,5 mit 4 mM $MgSO_4$

0,20 ml enteiweisste und neutralisierte Probe

0,10 ml 12 mM NADP

0,10 ml 16 mM ATP

werden in der Küvette gut durchmischt; die Extinktion E_1 wird abgelesen.

0,02 ml Enzym-Suspension (in 1 ml 1 mg Hexokinase + 1 mg Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase) werden innerhalb einer Versuchsreihe (K-Lsg. ohne Schnitte und K-Lsg. aus den Reaktionsgefässen eines manometrischen Versuches) jeweils zur gleichen Zeit nach Start mit Enzym-Suspension zugegeben. Bei allen Ansätzen wird genau 30 min nach Zugabe die Extinktion E_2 abgelesen.

Es sind die Chemikalien aus BOEHRINGER-Testpackungen verwendet worden. Da bei Verbrauch mehrerer Testpackungen beträchtliche Reste von Pufferlösung und Enzymsuspension übrigbleiben, wurden gelegentlich NADP- und ATP-Lösung extra angesetzt:

NADP, 12 mM.

210 mg NADP in 20 ml Wasser lösen.

ATP, 16 mM.

198 mg ATP in 20 ml Triäthanolaminpuffer, pH 7,5, lösen.

Berechnung: $(E_2-E_1) \times 10{,}89$ = mg Glukose / 3 ml K-Lsg. = G

(3 ml ist der Inhalt eines Reaktionsgefässes).

$$\frac{G_o - G_{Pr.}}{a} = \frac{\text{mg Glukose-Verbrauch}}{\text{mg Hirn-Trockensubstanz}}$$

(G_o: Glukose-Konzentration in der reinen K-Lsg.;

$G_{Pr.}$: Glukose-Konzentration in der K-Lsg. aus den Reaktionsgefässen).

a: mg Trockensubstanz pro Reaktionsgefäss.

Laktat:

Prinzip des Tests:

$$\text{Laktat} + \text{NAD} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Pyruvat} + \text{NADH} + H^+$$

Gebildetes Pyruvat wird mit Hydrazin als Hydrazon abgefangen (Verschiebung des Gleichgewichtes nach rechts).

Lösungen:

1. Glyzinpuffer, pH 9,0 , 0,5 M , mit 0,4 M Hydrazin.
   37,5 g Glyzin + 26 g Hydrazinsulfat + 1 g EDTA mit 5 ml 2 N NAOH und Wasser zu 250 ml lösen, 200 ml 2 N NaOH und 50 ml Wasser zugeben.

2. NAD, 27 mM.
   205,9 mg NAD in 10 ml Wasser lösen.

3. LDH, 2 mg/ml.
   1 Vol. Schweineherz-Laktat-Dehydrogenase (100 mg / 10 ml) wird unmittelbar vor Benutzung mit 4 Vol. Wasser verdünnt.

Durchführung:

2,00 ml Glycinpuffer mit Hydrazin und EDTA,

0,20 ml enteiweisste und neutralisierte Probe,

0,20 ml NAD-Lösung und

0,03 ml LDH-Lösung werden in der Küvette gut durchmischt, genau nach 1 Stunde wird die Extinktion $E_{Pr.}$ abgelesen. Ein Leerwert wird mit 0,20 ml einer Lösung angesetzt, die aus 1 ml K-Lsg., 4 ml 0,165 N $HClO_4$ und 3 ml 1,1 M K_2HPO_4 hergestellt wurde.

Diese Lösung wird in gleicher Weise gefällt und zentrifugiert wie die Proben aus den manometrischen Versuchen. Die Extinktion des Leerwertes E_o wird ebenfalls nach genau 1 Stunde abgelesen.

Berechnung: $\frac{(E_{Pr.} - E_o) \times 4,331}{a} = \frac{\text{mg Laktat-Bildung}}{\text{mg Hirn-Trockensubstanz}}$

a = mg Trockensubstanz pro Warburg-Gefäss (Hirnschnitte oder -suspension oder zellfreie Überstände aus der entsprechenden Menge Hirn-Trockensubstanz).

Pyruvat:

Prinzip des Tests:

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Laktat} + \text{NAD}$$

Lösungen:

1. NADH, 12 mM.
   110,28 mg NADH in 10 ml Triäthanolaminpuffer, pH 7,5 (vom Glukose-Test) lösen,
2. LDH, 0,75 mg/ml.
   1 Vol. Schweineherz-Laktat-Dehydrogenase (100 mg / 10 ml) wird unmittelbar vor Benutzung mit 1 Vol. 3,2 M $(NH_4)_2SO_4$-Lösung verdünnt.

Durchführung:

2,00 ml enteiweisste und neutralisierte Probe und

0,05 ml NADH-Lösung werden in der Küvette gut durchgemischt, die Extinktion E_1 wird abgelesen, nach 3 Minuten wird die Ablesung wiederholt: E_2.
(Ablesung E_1 lediglich zur Kontrolle, dass die Extinktion vor Zugabe des Enzyms sich nicht zu stark verändert),

0,05 ml LDH-Suspension werden zugegeben, es wird gut durchgemischt. Nach genau 5 Minuten wird die Extinktion abgelesen: E_3; diese Ablesung wird nach weiteren genau 5 Minuten wiederholt: E_4.

Berechnung: $$\frac{(E_2 - E_3 - (E_3 - E_4) \times 0{,}3659}{a} =$$

$$\frac{\text{mg Pyruvat-Bildung}}{\text{mg Hirn-Trockensubstanz.}}$$

a = mg Trockensubstanz pro Warburg-Gefäss

Glyzerin:

Prinzip des Tests:

Glyzerin + ATP $\xrightarrow{GK}$ Glyzerinphosphat + ADP

ADP + Phosphoenolpyruvat $\xrightarrow{PK}$ ATP + Pyruvat

Pyruvat + NADH + H^+ $\xrightarrow{LDH}$ Laktat + NAD

Durchführung:

2,50 ml 0,1 M Triäthanolaminpuffer, pH 7,6 mit 4 mM $MgSO_4$

0,10 ml NADH (6 mM), ATP (33 mM), Phosphoenolpyruvat (11 mM)

0,50 ml enteiweisste und neutralisierte Probe

0,02 ml Enzym-Suspension (in 1 ml 2 mg LDH + 1 mg PK)

werden in der Küvette gut durchmischt, die Extinktion wird auf einem Schreiber registriert. Bei Konstanz oder nur geringer und gleichmässiger Veränderung der Extinktion werden

0,02 ml Glyzerokinase-Suspension (2 mg GK/ml) zugegeben. Die Extinktion wird auf einem Schreiber bis zur Konstanz oder wenigstens geringer und gleichmässiger Veränderung registriert.

Es sind die Chemikalien aus BOEHRINGER-Testpackungen verwendet worden.

Berechnung:

$$\frac{(E_1 - E_2) \times 2{,}313}{a} = \frac{\text{mg Glyzerin}}{\text{mg Hirn-Trockensubstanz}}$$

E_1 = Extinktion vor Zugabe von Glyzerokinase

E_2 = Extinktion nach Ablauf der Reaktion, extrapoliert auf den Zeitpunkt der Zugabe von Glyzerokinase

a = mg Trockensubstanz pro Warburg-Gefäss

Adenosin-5'-monophosphat:

Prinzip des Tests:

$AMP + ATP \xrightarrow{MK} 2\ ADP$

$ADP + PEP \xrightarrow{PK} ATP + Pyruvat$

$Pyruvat + NADH + H^+ \xrightarrow{LDH} Laktat + NAD$

Durchführung:

0,9 ml Probe werden mit

3,6 ml 0,165 M $HClO_4$ versetzt und einige Stunden in der Kälte stehen gelassen, nach Zentrifugieren werden in das gleiche Zentrifugenglas vorsichtig

1,2 ml 0,43 M Triäthanolamin·HCl-Lösung mit 0,55 M K_2CO_3 gegeben. Man lässt einige Stunden in der Kälte stehen und zentrifugiert dann 10 Min bei 3000·g.

In eine 1 cm Küvette werden gegeben:

2,00 ml Überstand der enteiweissten und neutralisierten Probe

0,15 ml Phosphoenolpyruvat (10 mM), KCl (1,3 M), $MgSO_4$ (0,4 M)

0,10 ml NADH (12 mM), ATP (5 mM)

0,02 ml LDH-Suspension (1 mg/ml)

0,02 ml Pyruvat-Kinase-Suspension (1 mg/ml).
Nach Durchmischen wird die Extinktion bei 366 nm auf einem Schreiber bis zur Konstanz registriert.

0,02 ml Myokinase-Suspension (2 mg/ml) werden zugegeben, nach Durchmischen wird die Extinktion bei 366 nm bis zur Konstanz registriert.

Es werden die Chemikalien von BOEHRINGER-Testpackungen verwendet. NADH wird allerdings nur in der halben von BOEHRINGER vorgeschriebenen Menge Wasser gelöst; ausserdem werden zu 2,5 ml NADH-Lösung jeweils 7,7 mg ATP, Na-Salz, gegeben (Durchführbarkeit der AMP-Bestimmung in Abwesenheit von ADP).

Berechnung:

$$(E_1 - E_2) \times 1{,}108 = \frac{\mu\text{Mol 5'-AMP}}{\text{ml Probe}}$$

E_1 : Extinktion vor Zugabe von Myokinase

E_2 : Extinktion nach Ablauf der Reaktion, extrapoliert auf den Zeitpunkt der Zugabe von Myokinase.

3. DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE

3.1. Schnitte (vergl. hierzu Tab.I auf den Seiten 25-30).

3.1.1. Atmung

Wie bereits in einer Arbeit von J.DITTMANN u. H.D.HERRMANN mitgeteilt (9), wird die Atmung von Kaninchenhirn-Schnitten durch 0,1 bis 1 mM cAMP gesteigert. Diese Beobachtung konnte in unseren weiteren Versuchen bestätigt werden: Tab. I.

3.1.2. Glukolyse

Die Wirkungen von cAMP auf die Glukolyse der Schnitte sind in den einzelnen Zeiträumen nach Zugabe der Substanz unterschiedlich und werden dementsprechend hier auch getrennt besprochen:

3.1.2.1. Anfangsphase

Unmittelbar nach Einkippen von cAMP ist in allen Versuchen eine starke Steigerung der CO_2-Bildung gemessen worden. Diese CO_2-Bildung wurde in bikarbonathaltiger Lösung zunächst als Ausdruck einer Glukolyse betrachtet (9). Spezifische enzymatische Laktat-Bestimmungen brachten weitere Klärung:

In zwei Versuchen werden je zwei Gefässpaare mit Hirnschnitten zur Zeit T_o aus dem Thermostaten genommen. Zur Zeit T = 20 min nach dem Kippen werden die restlichen vier Gefässpaare herausgenommen. Nach Enteiweissung der klaren überstehenden Lösungen wird jeweils Laktat bestimmt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tab. II Laktat-Bildung durch Kaninchenhirn-Schnitte innerhalb der ersten 20 min nach Zugabe von cAMP, Endkonzentration 1 mM.

µg Laktat/mg Trs.

Experiment	Vor Zugabe (T = 0 min)	Nach Zugabe (T = 20 min) ohne cAMP	1 mM cAMP
1	25,6 ± 0,1	29,5 ± 0,8	31,3 ± 0,4
2	28,7 ± 0,8	34,0 ± 1,0	31,7 ± 1,3

Es fällt auf, dass in Versuch 1 in Gegenwart von cAMP die Milchsäure-Bildung gegenüber den Kontrollen leicht gesteigert ist, während in Versuch 2 eine Erniedrigung gefunden wird.
Die enzymatisch bestimmte Milchsäure ist mit dem manometrisch gefundenen Glukolyse CO_2 verglichen worden:

Tab. III Vergleich von enzymatisch und manometrisch gefundenem Laktat in Gegenwart von cAMP.

µg Laktat/mg Trs.

Experiment	Enzymatisch	Manometrisch
1	5,7	6,0
2	3,0	7,6

Aus Tab. II und III geht hervor, dass in beiden Versuchen innerhalb von 20 min nach dem Einkippen von cAMP noch Laktat gebildet wird. Andererseits hat eine Stimulierung der

Glukolyse über die Kontrollwerte hinaus nur in Experiment 1 stattgefunden (Tab. II). Die Diskrepanz kann erklärt werden durch eine allgemeine Beobachtung bei Stoffwechselmessungen: Während die Genauigkeit der enzymatischen Bestimmungen hoch ist, ist die grössere Schwankungsbreite in gleichartigen Versuchsansätzen durch die Inhomogenität des biologischen Materials bedingt.

Da jeweils manometrisch mehr aus Bicarbonat entwickeltes CO_2 gemessen wird, als dem enzymatisch gefundenen Laktat entspricht, muss ein Teil des Kohlendioxyds auf andere Weise freigesetzt worden sein. GREENGARD und Mitarbeiter (12) wiesen nach, dass bei der hydrolytischen Spaltung von cAMP zu 5'-AMP pro Mol Umsatz 0,86 Mol H^+-Jonen freigesetzt werden. Das bedeutet bei 3,0 ml 1 mM cAMP-Lösung pro Reaktionsgefäss, dass ca. 57,3 mm^3 CO_2 durch Hydrolyse von cAMP entwickelt werden können. Diese CO_2-Mengen werden innerhalb 20 min nicht erreicht.

In der folgenden Tabelle (Tab. IV) wird die pro Mol cAMP verursachte Säurebildung auf molarer Basis für alle Versuche berechnet. Man erkennt, dass der nach GREENGARD zu erwartende Quotient von 0,86 Mol H^+ pro Mol cAMP exakt zwar nie, wenn auch in einigen Versuchen annähernd erreicht wird.

Die Abhängigkeit der Stoffwechselgrössen von unterschiedlichen Glukose-Konzentrationen in Gegenwart von cAMP ist bei den verschiedenen durchgeführten Versuchen uneinheitlich.

Tab.IV Die Stöchiometrie der Glukolyse-Steigerung durch Adenosin-3',5'-monophosphat.

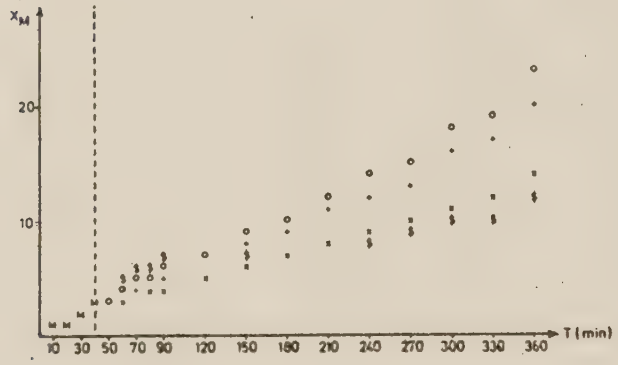
Versuch	Glukose (mg/ml)	cycl.AMP (mM)	$\Delta x_{(\mu L)^H max.}$	$\frac{\mu \text{ Mol Lactat}}{\mu \text{ Mol cycl.AMP}}$
1)	2	1,0	50,9	0,76
2)	1	1,0	54,5	0,82
3)	1	0,5	26.3	0,79
4)	0,5	0,1	3,7	0.53
5)	1	1,0	40,6	0,61
6)	0,5	0,5	20.0	0,60
	1	1,0	26,9	0,81
7)	1	1,0	50,9	0,76
	2	1,0	42,3	0,63
	4	1,0	43,2	0,65
8)	1	0,5	15,0	0,45
	2	0,5	7,0	0,21
	4	0,5	14,9	0,45
10)	4	0,5	15,4	0,46
11)	1	1,0	28,1	0,42
12)	1	0,5	12,4	0,37
	1	1,0	39,2	0,59
	1	2,0	112.9	0,85
13)	0,5	0,5	20,2	0,61
	1	0,5	20,8	0,62

3.1.2.2. Endphase

Die Hemmung der Glukolyse durch cAMP in der Endphase ist konzentrationsabhängig. Besonders anschaulich zeigt dies der Versuch 5 aus Tabelle I in folgender graphischer Darstellung (Abb. 2).

Abbildung 2.

Zeitlicher Verlauf von x_M



Zugabe von cAMP nach T = 40 min

Symbole: o = Kontrolle x = 0,1 mM cAMP

\+ = 0,01 mM cAMP $ = 1,0 mM cAMP

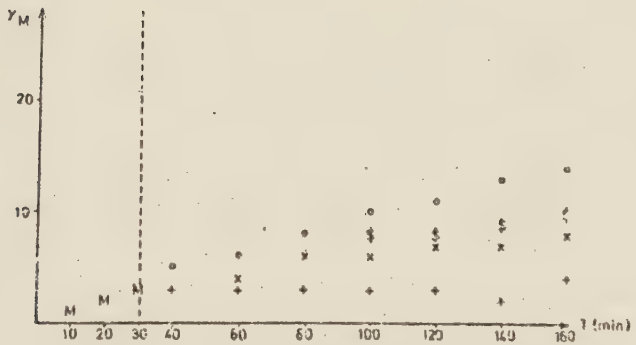
1 mM cAMP und höhere Konzentrationen hemmen die Glukolyse stark bis vollständig (siehe auch Tab. I). Niedrigere Konzentrationen haben eine weit geringere Wirkung auf die Glukolyse.

3.1.2.2.1. Einfluß von 5'-AMP auf die Glukolyse

Der im vorigen Abschnitt beschriebene Hemm-Effekt konnte zunächst nicht geklärt werden. Versuche mit 5'-AMP ergaben ebenfalls eine deutliche Hemmwirkung (Abb. 3).

Abbildung 3.

Zeitlicher Verlauf von x_M



x_M wurde mit dem Faktor 3,0 multipliziert

Zugabe von 5'-AMP nach T = 30 min

o = Kontrolle x = 0,1 mM 5'-AMP

$ = 0,05 mM 5'-AMP + = 0,5 mM 5'-AMP

Auch hier ist die Hemmung der Glukolyse konzentrationsabhängig. 0,05 mM 5'-AMP hemmt lediglich schwach, dagegen 0,5 mM 5'-AMP fast vollständig.

In den weiteren Versuchen ist dieses Ergebnis bestätigt worden. (Tab. V).

Die Erniedrigung der Milchsäurebildung ging auch aus enzymatischen Laktat-Bestimmungen hervor.

Tab.I Der Einfluß von Adenosin-3',5'-monophosphat auf aerobe Glukolyse und Atmung von Kaninchenhirn-Schnitten.

1. Glukolyse

a. 20 % O_2 , 5 % CO_2

$$Q_M = \frac{mm^3 \text{ Glukolyse} - CO_2}{mg \text{ Trs.} \times \text{Stunde}}$$

Versuch	Glukose (mg/ml)	Vor Zugabe	0 - 30 Min nach Zugabe	70 - 120 Min nach Zugabe
1) Kontrolle	2	+ 2,6	+ 1,6	+ 2,1
cycl.AMP 1,0 mM			+ 8,0	- 0,2
2) Kontrolle	1	+ 3,1	+ 2,4	+ 2,3
cycl.AMP 1,0 mM			+ 8,6	+ 0,5
3) Kontrolle	1	+ 2,2	+ 2,0	+ 2,5
cycl.AMP 0,5 mM			+ 9,5	- 0,3
4) Kontrolle	0,5	+ 1,7	+ 2,2	+ 1,1
cycl.AMP 0,1 mM			+ 1,4	+ 0,3
5) Kontrolle	1	+ 3,9	+ 3,4	+ 3,1
cycl.AMP 0,01 mM			+ 3,0	+ 3,0
cycl.AMP 0,1 mM			+ 2,4	+ 2,2
cycl.AMP 1,0 mM			+ 7,8	+ 0,4
6) Kontrolle	0,5	+ 2,2	+ 2,0	+ 0,7
cycl.AMP 0,5 mM			+ 4,6	+ 0,2

(Fortsetzung Tab. I)

b. 20 % O_2 , 2 % CO_2

Versuch	Glukose (mg/ml)	Q_M Vor Zugabe	0 - 30 Min nach Zugabe	70 - 120 Min nach Zugabe
7) Kontrolle	1	+ 2,5	+ 1,3	+ 0,9
cycl.AMP 1,0 mM	1		+ 6,7	+ 0,1
Kontrolle	2		+ 2,2	+ 1,2
cycl.AMP 1,0 mM	2		+ 7,3	+ 0,3
Kontrolle	4		+ 1,6	+ 1,3
cycl.AMP 1,0 mM	4		+ 6,4	+ 0,2
8) Kontrolle	1	+ 1,2	+ 1,0	+ 0,5
cycl.AMP 0,5 mM	1		+ 1,7	+ 1,0
Kontrolle	2		+ 1,6	+ 0,7
cycl.AMP 0,5 mM	2		+ 1,7	+ 0,4
Kontrolle	4		+ 1,3	+ 0,7
cycl.AMP 0,5 mM	4		+ 2,6	+ 0,2
c. 4 % O_2 , 5 % CO_2				
9) Kontrolle	0,5	+ 3,3		
cycl.AMP 0,5 mM	0,5		+ 5,6	+ 1,4
cycl.AMP 0,5 mM	4		+ 4,4	+ 2,8
10)Kontrolle	1	+ 4,5		
Kontrolle	4		+ 5,6	+ 5,3
cycl.AMP 0,5 mM	4		+ 6,1	+ 4,4

(Fortsetzung Tab. I)

Versuch	Glukose (mg/ml)	Q_M Vor Zugabe	0 - 30 Min nach Zugabe	70 - 120 Min nach Zugabe
11) Kontrolle	1	+ 4,0	+ 3,3	+ 1,8
cycl.AMP 1,0 mM	1		+ 4,5	+ 1,7
Kontrolle	2		+ 2,5	+ 1,9
cycl.AMP 1,0 mM	2		+ 5,1	+ 2,4
Kontrolle	4		+ 3,5	+ 2,9
cycl.AMP 1,0 mM	4		+ 6,4	+ 3,7
12) Kontrolle	1	+ 5,5	+ 5,3	+ 4,9
cycl.AMP 0,5 mM			+ 6,6	+ 4,3
cycl.AMP 1,0 mM			+ 9,4	+ 3,5
cycl.AMP 2,0 mM			+12,7	+ 4,2
13) Kontrolle	0,5	+ 2,9	+ 3,0	+ 2,3
cycl.AMP 0,5 mM	0,5		+ 5,7	+ 1,4
cycl.AMP 0,5 mM	4		+ 6,3	+ 1,8
14) Kontrolle	0,5	+ 3,5	+ 4,1	+ 3,1
cycl.AMP 0,1 mM	0,5		+ 3,3	+ 2,6
Kontrolle	4		+ 3,3	+ 3,0
cycl.AMP 0,1 mM	4		+ 3,9	+ 2,9

(Fortsetzung Tab. I)

2. Atmung

a. 20 % O_2 , 5 % CO_2

$$Q_{O_2} = \frac{mm^3\ O_2}{mg\ Trs. \times Stunde}$$

V e r s u c h	Glukose (mg/ml)	Vor Zugabe	0 - 30 Min nach Zugabe	70 - 120 Min nach Zugabe
1) Kontrolle	2	- 4,7	- 3,9	- 3,6
cycl.AMP 1,0 mM			- 3,8	- 5,3
2) Kontrolle	1	- 3,8	- 3,2	- 4,1
cycl.AMP 1,0 mM			- 4,0	- 6,4
3) Kontrolle	1	- 4,4	- 3,2	- 4,3
cycl.AMP 0,5 mM			- 4,0	- 5,6
4) Kontrolle	0,5	- 4,7	- 3,9	- 4,2
cycl.AMP 0,1 mM			- 4,4	- 4,3
5) Kontrolle	1	- 5,0	- 3,8	- 4,0
cycl.AMP 0,01 mM			- 4,8	- 4,1
cycl.AMP 0,1 mM			- 5,4	- 4,8
cycl.AMP 1,0 mM			- 4,4	- 4,7
6) Kontrolle	0,5	- 5,3	- 4,1	- 4,0
cycl.AMP 0,5 mM			- 6,5	- 5,2

(Fortsetzung Tab. I)

b. 20 % O_2 , 2 % CO_2		Q_{O_2}		
V e r s u c h	Glukose (mg/ml)	Vor Zugabe	0 - 30 Min nach Zugabe	70 - 120 Min nach Zugabe
7) Kontrolle	1	- 4,2	- 4,2	- 4,2
cycl.AMP 1,0 mM	1		- 4,1	- 5,0
Kontrolle	2		- 5,0	- 4,7
cycl.AMP 1,0 mM	2		- 4,1	- 4,4
Kontrolle	4		- 4,6	- 4,3
cycl.AMP 1,0 mM	4		- 4,6	- 4,9
8) Kontrolle	1	- 4,0	- 4,2	- 4,4
cycl.AMP 0,5 mM	1		- 4,0	- 4,4
Kontrolle	2		- 4,0	- 4,4
cycl.AMP 0,5 mM	2		- 4,5	- 4,9
Kontrolle	4		- 3,8	- 4,3
cycl.AMP 0,5 mM	4		- 3,6	- 4,2
c. 4 % O_2 , 5 % CO_2				
9) Kontrolle	0,5	- 2,4		
cycl.AMP 0,5 mM	0,5		- 2,5	- 2,2
cycl.AMP 0,5 mM	4		- 2,5	- 2,1
10)Kontrolle	1	- 3,3		
Kontrolle	4		- 2,7	- 2,3
cycl.AMP 0,5 mM	4		- 2,7	- 2,5

(Fortsetzung Tab. I)

Versuch	Glukose (mg/ml)	Q_{O_2} Vor Zugabe	0 - 30 Min	70 - 120 Min nach Zugabe
11)Kontrolle	1	- 2,6	- 1,9	- 1,6
cycl.AMP 1,0 mM	1		- 1,9	- 1,6
Kontrolle	2		- 2,2	- 2,1
cycl.AMP 1,0 mM	2		- 1,3	- 0,8
Kontrolle	4		- 2,1	- 2,1
cycl.AMP 1,0 mM	4		- 2,4	- 2,3
12)Kontrolle	1	- 3,0	- 1,9	- 1,4
cycl.AMP 0,5 mM			- 2,4	- 2,4
cycl.AMP 1,0 mM			- 2,0	- 2,9
cycl.AMP 2,0 mM			- 0,9	- 2,0
13)Kontrolle	0,5	- 2,9	- 1,9	- 1,7
cycl.AMP 0,5 mM	0,5		- 1,6	- 1,9
cycl.AMP 0,5 mM	4		- 1,6	- 1,9
14)Kontrolle	0,5	- 4,1	- 3,0	- 2,5
cycl.AMP 0,1 mM	0,5		- 0,6	- 2,9
Kontrolle	4		- 1,9	- 2,4
cycl.AMP 0,1 mM	4		- 3,0	- 2,6

Tab.V Der Einfluss von 5'-AMP auf aerobe Glukolyse und Atmung von Kaninchenhirn-Schnitten

1. Atmung

75% N_2, 20% O_2, 5% CO_2 $\qquad Q_{O_2} = \frac{mm^3 O_2}{mg\ Trs.\ und\ Stunde}$

Experiment	vor Zugabe 0-10 min	nach Zugabe 0-40 min	40-80 min	80-120 min
S 1				
Kontrolle	- 5,4	- 4,8	- 4,5	- 4,5
1 mM 5'-AMP		- 4,9	- 4,8	- 4,5
0,5 mM 5'-AMP		- 5,2	- 4,2	- 4,3
S 2				
Kontrolle	- 5,6	- 4,9	- 4,9	- 4,8
0,5 mM 5'-AMP		- 4,6	- 4,5	- 5,1
0,1 mM 5'-AMP		- 4,4	- 4,8	- 4,0
0,05 mM 5'-AMP		- 4,6	- 5,4	- 4,5
S 3				
Kontrolle	- 4,3	- 4,1	- 3,5	- 3,8
1 mM 5'-AMP		- 3,8	- 3,6	- 4,0

(Fortsetzung Tab.V)

2. Glukolyse
75% N_2, 20% O_2, 5% CO_2

$$Q_M = \frac{mm^3 \text{ Glukolyse-}CO_2}{mg \text{ Trs. und Stunde}}$$

Experiment	vor Zugabe 0-10 min	nach Zugabe 0 - 40 min	40-80 min	80-120 min
S 1				
Kontrolle	+ 2,5	+ 2,3	+ 2,0	+ 2,0
1 mM 5'-AMP		+ 0,6	- 0,2	- 0,2
0,5 mM 5'-AMP		+ 0,6	+ 0,3	+ 0,8
S 2				
Kontrolle	+ 1,9	+ 1,7	+ 1,7	+ 1,2
0,5 mM 5'-AMP		+ 0,1	± 0,0	- 0,1
0,1 mM 5'-AMP		+ 1,2	+ 0,6	+ 0,5
0,05 mM 5'-AMP		+ 1,7	+ 1,0	+ 0,8
S 3				
Kontrolle	+ 2,8	+ 1,6	+ 1,1	+ 1,0
1 mM 5'-AMP		+ 0,3	- 0,3	- 0,1

3.1.2.2.2. 5'-AMP-Bestimmungen in Proben aus Versuchen mit cAMP

Nachdem die Hemmwirkung des 5'-AMP auf die Glukolyse von Hirnschnitten beobachtet worden war, wurde untersucht, ob während der Inkubation aus cAMP 5'-AMP gebildet worden war. Damit wäre die Hemmwirkung des cAMP in der Endphase erklärt.

Tabelle VI 5'-AMP-Bestimmung in Schnitten nach Zugabe von 1 mM cAMP

Zeit	5'-AMP
0 min	0,95 ± 0,0 mM
15 min	0,80 ± 0,0 mM
30 min	0,65 ± 0,0 mM
60 min	0,55 ± 0,0 mM

In den Proben, die bereits unmittelbar nach Einkippen von cAMP aus dem Thermostaten genommen werden, ist das cAMP fast vollständig in 5'-AMP umgewandelt. In den später entnommenen Proben werden bedeutend geringere Mengen 5'-AMP gefunden. Das deutet auf einen weiteren Abbau des 5'-AMP hin.

Die Zeitangaben in der Tabelle beziehen sich lediglich auf die Inkubationszeiten im Thermostaten. Nicht berücksichtigt wird die Zeit von 5-10 min, die zwischen der Herausnahme der Gefässe aus dem Thermostaten und der Abtrennung der Schnitte von den Inkubationslösungen vergeht.

Die Hemmwirkung des cAMP auf die Glukolyse der Schnitte ist also eine Wirkung des 5'-AMP, das bei der Umwandlung entsteht.

3.2. Zellfreie Überstände

3.2.1. Atmung

Es wurden drei manometrische Versuche durchgeführt, deren Ergebnisse in der Tabelle VII zusammengefasst dargestellt sind.

Die sehr niedrige Atmung der Kontrollversuche wird durch cAMP nur geringfügig gesteigert. Dieser Effekt lässt bei einigen Versuchen im Lauf der Inkubationsdauer nach. Erhöhung von cAMP-, HCO_3^-- und Glukose-Konzentrationen sowie Zugabe von Mg^{++}-Ionen steigern die Atmung nicht stärker.

3.2.2. Glukolyse

Die Kontrollversuche zeigen kaum Glukolyse. Bei Zugabe von cAMP erscheint sie gesteigert. Diese Steigerung nimmt mit zunehmender cAMP-Konzentration zu; sie ist aber nicht von Glukose, HCO_3^- und Mg^{++} abhängig (Tab. VII).

3.2.3. Enzymatische Milchsäure-Bestimmungen

Weder in Kontrollgefässen noch bei Versuchen mit Zusatz von cAMP ist Bildung von Milchsäure nachgewiesen worden. Auch bei Inkubation in einem kompletten Medium nach LePAGE (Zusammensetzung siehe unter 3.3.) wird keine Milchsäure gebildet. Selbst in anaerob inkubierten Proben gleicher Zusammensetzung findet keine Glukolyse statt. Auf die Darstellung dieser Versuche ist deshalb verzichtet worden.

Tabelle VII Der Einfluss von cAMP auf zellfreie Überstände

1. Atmung

83 % N_2, 12 % O_2, 5 % CO_2

$$Q_{O_2} = \frac{mm^3\ O_2}{mg\ Trs. \times Stunde}$$

Bei Berechnung der Q-Werte wurden die Trockensubstanzgewichte der Schnitte berücksichtigt, aus denen die Überstände gewonnen wurden.

Experiment	vor Zugabe 0 - 10 min	nach Zugabe 0 - 60 min	60 - 150 min	150 - 210 min
Ü 1				
Kontrolle	- 0,5	- 0,6	- 0,7	- 0,4
1 mM cAMP + 45mM $NaHCO_3$	- 0,7	- 1,1	- 2,1	- 1,2
1 mM cAMP + 45mM $NaHCO_3$+ 8 mM $MgCL_2$	- 0,6	- 1,2	- 0,9	- 0,3
Ü 2				
Kontrolle	- 0,6	- 0,7	0,0	0,0
1 mM cAMP + 45mM $NaHCO_3$	- 0,7	- 1,6	+ 0,1	- 0,1
1 mM cAMP + 45mM $NaHCO_3$+ 0,45 mg Glukose/100ml	- 0,5	+ 0,1	- 0,9	- 0,1
1 mM cAMP + 45mM $NaHCO_3$+ 1,8 mg Glukose/100ml	- 0,5	+ 0,1	+ 0,3	0,0

(Fortsetzung Tabelle VII)

83 % N_2, 12 % O_2, 5 % CO_2 $\quad Q_{O_2}$

Experiment	vor Zugabe 0 – 10 min	nach Zugabe 0 – 60 min	60 – 150 min	150 – 210 min
Ü 3				
Kontrolle	– 0,3	– 0,3	– 0,4	– 0,2
0,5 mM cAMP + 45 mM $NaHCO_3$	– 0,4	– 0,8	+ 0,3	– 0,9
1 mM cAMP + 45 mM $NaHCO_3$	– 0,4	– 2,4	+ 0,1	– 0,7
2 mM cAMP + 45 mM $NaHCO_3$	– 0,3	– 1,2	– 0,5	– 0,7

(Fortsetzung Tabelle VII)

83 % N_2, 12 % O_2, 5 % CO_2

$$Q_{CO_2} = \frac{\text{durch } H^+ \text{ freigesetzte } mm^3\ CO_2}{\text{mg Trs. x Stunde}}$$

Experiment	vor Zugabe 0 - 10 min	nach Zugabe 0 - 60 min	60 - 150 min	150 - 210 min
Ü 1				
Kontrolle	+ 0,5	+ 0,6	+ 0,7	+ 1,5
1 mM cAMP + 45 mM $NaHCO_3$	+ 0,8	+ 4,0	+ 2,4	+ 3,0
1 mM cAMP + 45 mM $NaHCO_3$ + 8 mM $MgCL_2$	+ 0,6	+ 4,8	+ 3,0	+ 3,5
Ü 2				
Kontrolle	+ 0,6	+ 0,1	± 0,0	± 0,0
1 mM cAMP + 45 mM $NaHCO_3$	+ 0,8	+ 3,4	+ 3,9	+ 1,3
1 mM cAMP + 45 mM $NaHCO_3$ + 0,45 mg Glukose/100 ml	+ 0,7	+ 4,7	+ 3,5	+ 1,3
1 mM cAMP + 45 mM $NaHCO_3$ + 1,8 mg Glukose/100 ml	+ 0,6	+ 4,8	+ 2,1	+ 2,1

(Fortsetzung Tabelle VII)

83 % N_2, 12 % O_2, 5 % CO_2 $\quad Q_{CO_2}$

Experiment	vor Zugabe 0 - 10 min	nach Zugabe 0 - 60 min	60 - 150 min	150 - 210 min
Ü 3				
Kontrolle	+ 0,4	+ 0,6	+ 0,5	- 0,3
0,5 mM cAMP + 45 mM $NaHCO_3$	+ 0,5	+ 1,4	+ 1,7	- 0,2
1 mM cAMP + 45 mM $NaHCO_3$	+ 0,3	+ 3,5	+ 2,6	+ 0,2
2 mM cAMP + 45 mM $NaHCO_3$	+ 0,4	+ 4,6	+ 4,3	+ 3,6

3.2.4. Enzymatische Glyzerin-Bestimmungen

Bei einer Lipolyse werden Glyzerin und Fettsäuren gebildet. Letztere setzen aus HCO_3^- CO_2 frei. Wegen des negativen Ausfalls der Milchsäure-Bestimmungen wurde daher geprüft, ob cAMP eine Lipolyse induziert hatte. Da die enzymatischen Bestimmungsmethoden empfindlicher reagieren als die von Fettsäuren, wurden die Proben auf Glyzerin untersucht. Ergebnis: Glyzerin konnte nicht nachgewiesen werden. Daraus folgt, dass durch cAMP keine Lipolyse ausgelöst wird.

3.2.5. 5'-AMP-Bestimmungen

Analog den Versuchen mit Schnitten wurde geprüft, ob sich cAMP in 5'-AMP umwandelt und dabei H^+-Ionen frei werden.

Tabelle VIII

5'-AMP-Bestimmungen in zellfreien Überständen nach Zugabe von 1 mM cAMP

Zeit	5'-AMP
0 min	0,02 ± 0,01 mM
15 min	0,23 ± 0,0 mM
30 min	0,41 ± 0,04 mM
60 min	0,77 ± 0,02 mM

Aus Tabelle VIII geht hervor, dass mit zunehmender Inkubationsdauer aus cAMP steigende Mengen von 5'-AMP gebildet werden. Nach einer Stunde sind mehr als 3/4 des cAMP umgesetzt. Die Erklärung für "glukolytisch" gebildetes CO_2 trotz fehlender Bildung von Milchsäure liegt also darin,

dass cAMP zu 5'-AMP hydrolysiert wird und dabei H^+-Ionen bildet, die aus Bikarbonat die entsprechende Menge CO_2 freisetzen.

Übereinstimmung mit diesem Ergebnis zeigen auch die in der folgenden Tabelle IX zusammengestellten Berechnungen:

Tabelle IX

Vergleich der in zellfreien Überständen entstandenen CO_2-Mengen mit dem nach vollständiger Spaltung von cAMP zu erwartenden CO_2 (GREENGARD)

cAMP-Konzentration	CO_2 (gebildet)	CO_2 (berechnet)
0,5 mM cAMP	22,8 mm^3 22,6 mm^3	28,6 mm^3 28,6 mm^3
1,0 mM cAMP	52,3 mm^3 47,3 mm^3	57,3 mm^3 57,3 mm^3
2,0 mM cAMP	100,7 mm^3 100,9 mm^3	114,6 mm^3 114,6 mm^3

Bei keinem Versuch wird nach dem Einkippen von cAMP mehr CO_2 gebildet, als nach hydrolytischer Spaltung zu erwarten ist.

3.3. Suspensionen

3.3.1. Atmung

Es ist bekannt, dass Hirnsuspensionen in vitro Glukose respiratorisch und glukolytisch abbauen, wenn die Inkubationslösung bestimmte Zusätze enthält. Hier wurde das Medium nach LePAGE (19) mit folgender Zusammensetzung verwendet:

Fructose-1,6-diphosphat	2,5 mM
NAD	0,5 mM
Nicotinsäureamid	40,0 mM
$MgCl_2$	8,0 mM
$NaHCO_3$	45,0 mM

Die Atmung ist sehr niedrig. Sie wird durch 0,7 mM ATP und durch 1 mM cAMP nicht gesteigert (Tab. X).

3.3.2. Glukolyse (siehe Tab. X und XI)

In den Kontrollgefässen ohne cAMP werden nur sehr geringe Mengen von Milchsäure gebildet. Zusatz von 0,7 mM ATP (entsprechend der Originalvorschrift von LePAGE) oder 1,0 mM cAMP lösen starke Glukolyse unter aeroben und auch unter anaeroben Bedingungen aus. Zwischen Versuchen mit ATP und cAMP bestehen allerdings Unterschiede im Zeitverlauf: In den Gefässen mit Zusatz von ATP wird maximale Glukolyse-Geschwindigkeit in den ersten 20 min nach Zugabe der Substanz erreicht; bei Zugabe von cAMP tritt maximaler Stoffwechsel erst nach ca. 40 min auf. Gemeinsame Zugabe von ATP + cAMP verursacht keine zusätzliche Steigerung der Glukolyse. Die maximale Glukolysegeschwindigkeit ist unabhängig davon, ob 0,5 , 1 oder 2 mM cAMP zugesetzt wird. Es besteht dagegen ein Unterschied im Zeitverlauf: In Gegenwart der höchsten cAMP-Konzentration hält die Glukolyse ca. 20 min länger an.

Zugabe von 45 mg Glukose/100 ml oder 360 mg Glukose/100 ml zu den Inkubationslösungen mit einem Gehalt von ca. 45 mg Glukose/100 ml beeinflusst die cAMP-Wirkung nicht.

Tabelle X Der Einfluss von cAMP auf aerobe Glukolyse und Atmung von Suspensionen

1. Atmung

75 % N_2, 20 % O_2, 5 % CO_2 $\qquad Q_{O_2} = \frac{mm^3\ O_2}{mg\ Trs. \times Stunde}$

Inkubationslösung nach LePAGE in allen Gefässen

Experiment	vor Zugabe 0 – 10 min	nach Zugabe 0 – 10 min	10 – 30 min	30 – 60 min	60 – 100 min
H 4					
0,7 mM ATP	– 0,5	+ 1,5	– 0,7	– 0,3	– 0,3
0,7 mM ATP	– 0,7	+ 0,8	0,0	–	–
0,7 mM ATP 1,0 mM cAMP	– 0,6	+ 1,0	– 0,1	– 0,5	– 0,7
0,7 mM ATP 1,0 mM cAMP	– 0,8	+ 1,9	+ 0,3	–	–
1,0 mM cAMP	– 0,6	+ 2,1	– 0,3	– 0,5	– 0,9
1,0 mM cAMP	– 0,7	+ 2,1	+ 0,6	–	–

(Fortsetzung Tabelle X)

2. Glukolyse

$$Q_M = \frac{mm^3 \text{ Glukolyse-}CO_2}{mg \text{ Trs. x Stunde}}$$

Inkubationslösung nach LePAGE in allen Gefässen

Experiment	vor Zugabe 0 - 10 min	nach Zugabe 0 - 10 min	10 - 30 min	30 - 60 min	60 - 100 min
H 4					
0,7 mM ATP	+ 1,0	+ 8,1	+ 6,3	+ 7,0	+ 3,0
0,7 mM ATP	+ 1,2	+ 7,0	+ 5,4	-	-
0,7 mM ATP 1,0 mM cAMP	+ 1,1	+ 11,9	+ 6,6	+ 6,4	+ 3,1
0,7 mM ATP 1,0 mM cAMP	+ 1,3	+ 10,3	+ 9,0	-	-
1,0 mM cAMP	+ 1,1	+ 2,2	+ 4,8	+ 4,8	+ 5,1
1,0 mM cAMP	+ 1,2	+ 1,3	+ 6,0	-	-

Tabelle XI Der Einfluss von cAMP auf die anaerobe Glukolyse von Hirnsuspensionen

95 % N_2, 5 % CO_2

$$Q_M = \frac{mm^3 \text{ Glukolyse-}CO_2}{mg \text{ Trs. und Stunde}}$$

Alle Versuche enthalten das Inkubationsmedium nach LePAGE

Experiment	vor Zugabe 0 – 15 min	nach Zugabe 0 – 20 min	20 – 50 min	50 – 70 min
H 1				
a) Kontrolle	– 0,2	– 0,2	± 0,0	+ 0,1
b) 1 mM cAMP	+ 0,4	+ 6,2	+ 12,9	+ 10,5
c) 1 mM cAMP	+ 0,6	+ 6,9	+ 13,9	+ 6,9

H 2	10 – 15 min	0 – 20 min	20 – 40 min	40 – 60 min	60 – 90 min
a) 0,7 mM cAMP	+ 1,3	+ 8,2	+ 4,8	–	–
b) 0,7 mM cAMP	+ 1,2	+ 7,9	+ 5,2	+ 3,7	+ 1,2
c) 2,0 mM cAMP	+ 1,3	+ 8,8	+ 9,4	+ 5,7	+ 1,1
d) 2,0 mM cAMP + 0,7 mM ATP	+ 1,3	+ 9,2	+ 9,3	–	–
e) 0,5 mM cAMP + 0,7 mM ATP	+ 0,9	+ 8,0	+ 6,1	+ 4,7	+ 0,8
f) 0,5 mM cAMP + 0,7 mM ATP	+ 1,0	+ 7,4	+ 5,3	–	–

(Fortsetzung Tabelle XI)

Q_M

Experiment	vor Zugabe 0 - 15 min	nach Zugabe 0 - 20 min	20 - 40 min	40 - 60 min	60 - 90 min
H 2					
g) 0,5 mM cAMP	+ 0,8	+ 6,1	+ 6,7	+ 3,1	+ 1,8
h) 0,5 mM cAMP	+ 0,7	+ 6,8	+ 7,2	-	-
i) 1 mM cAMP	+ 0,8	+ 6,8	+ 7,0	+ 5,2	+ 0,9
j) 2 mM cAMP	+ 1,2	+ 6,8	+ 7,6	+ 7,0	+ 1,4
k) 2 mM cAMP	+ 0,9	+ 6,9	+ 8,3	-	-
l) 1 mM cAMP + 0,7 mM ATP	+ 0,8	+ 8,8	+ 7,1	+ 5,8	+ 0,6

(Fortsetzung Tabelle XI)

Q_M

Experiment	vor Zugabe 0 – 15 min	nach Zugabe 0 – 20 min	20 – 40 min	40 – 60 min	60 – 90 min
H 3					
a) 0,7 mM ATP	+ 1,3	+ 9,2	+ 6,1	+ 4,2	+ 1,3
b) 0,7 mM ATP	+ 1,2	+ 9,1	+ 6,0	+ 3,9	+ 1,6
c) 0,7 mM ATP + 45mg/100ml Glukose	+ 1,3	+ 9,3	+ 6,4	+ 4,2	+ 0,9
d) 0,7 mM ATP + 45mg/100ml Glukose	+ 1,4	+ 8,7	+ 5,7	+ 4,0	+ 1,7
e) 1 mM cAMP	+ 1,1	+ 5,7	+ 6,3	+ 3,4	+ 1,5
f) 1 mM cAMP	+ 1,2	+ 6,2	+ 6,9	+ 3,5	+ 1,6

(Fortsetzung Tabelle XI)

Q_M

Experiment	vor Zugabe 0 - 15 min	nach Zugabe 0 - 20 min	20 - 40 min	40 - 60 min	60 - 90 min
H 3					
g) 1 mM cAMP + 45mg/100ml Glukose	+ 1,3	+ 6,1	+ 7,3	+ 4,1	+ 1,7
h) 1 mM cAMP + 45mg/100ml Glukose	+ 1,2	+ 7,4	+ 7,2	+ 4,4	+ 1,7
i) 1 mM cAMP + 360mg/100ml Glukose	+ 1,3	+ 6,6	+ 7,0	+ 4,1	+ 1,8
j) 1 mM cAMP + 360mg/100ml Glukose	+ 1,3	+ 6,3	+ 6,9	+ 3,8	+ 2,1
k) 0,7 mM ATP + 360mg/100ml Glukose	+ 1,1	+ 8,6	+ 5,5	+ 5,6	+ 1,3
l) 0,7 mM ATP 360mg/100ml Glukose	+ 1,3	+ 8,3	+ 6,7	+ 4,5	+ 1,9

Tabelle XII

Bestimmungen von Laktat und Pyruvat

Suspensionsversuch H 1 (anaerob):

Gefäß	Laktat (µg/mg Trs.)	Pyruvat (µg/mg Trs.)
a)	3,7	0,0
b)	66,2	19,8
c)	67,9	19,4

Suspensionsversuch H 2 (anaerob):

Gefäß	Laktat (µg/mg Trs.)	Pyruvat (µg/mg Trs.)
a)	36,4	12,7
b)	36,2	10,8
c)	39,2	11,3
d)	40,2	12,2
e)	42,7	12,0
f)	41,8	12,1
g)	37,4	10,9
h)	35,6	12,9
i)	42,3	12,3
j)	42,7	12,9
k)	38,9	10,1
l)	43,8	11,1

(Fortsetzung Tabelle XII)

Suspensionsversuch H 3 (anaerob):

Gefäß	Laktat (µg/mg Trs.)	Pyruvat (µg/mg Trs.)
a)	39,0	11,9
b)	38,0	12,0
c)	36,8	11,7
d)	36,1	11,9
e)	36,1	12,9
f)	36,6	12,3
g)	36,5	11,0
h)	34,4	10,6
i)	36,6	10,3
j)	37,6	10,7
k)	35,1	10,8
l)	35,6	11,0

(Fortsetzung Tabelle XII)

Suspensionsversuch H 4 (aerob):

	Laktat (µg/mg Trs.)	Pyruvat (µg/mg Trs.)
1. Gefäßpaar:	28,5	3,0
	28,9	3,7
2. Gefäßpaar:	26,3	3,9
	28,7	4,5
3. Gefäßpaar:	29,2	3,4
	31,0	3,3
4. Gefäßpaar:	28,9	3,6
	30,1	3,2
5. Gefäßpaar:	30,8	2,2
	30,7	3,1
6. Gefäßpaar:	26,5	4,9
	29,9	3,0

Die enzymatischen Bestimmungen bestätigen, dass nach Zugabe von ATP und auch von cAMP, im Gegensatz zu den Versuchen mit zellfreien Überständen, Milchsäure neben kleineren Mengen von Brenztraubensäure gebildet wird (Tab. XII).

3.3.3. 5'-AMP - Bestimmungen in Suspensionen

Wie in Versuchen mit Schnitten und zellfreien Überständen wurden auch bei einem Suspensionsversuch Bestimmungen von 5'-AMP durchgeführt (Tab. XIII).

Tabelle XIII

5'-AMP-Bestimmungen in Suspensionen nach Zugabe von 1mM cAMP

Zeit	5'-AMP
0 min	0,12 ± 0,02 mM
15 min	0,66 ± 0,05 mM
30 min	0,16 ± 0,0 mM
60 min	0,0 ± 0,0 mM

Die Zeitangaben beziehen sich auf die Inkubationszeiten im Thermostaten. Nicht berücksichtigt wurde die Zeit zwischen Herausnahme der Gefässe und der Bestimmung von 5'-AMP.

Nach 15 min Inkubationsdauer waren 2/3 des cAMP in 5'-AMP umgewandelt worden. Nach 60 min lag allerdings kein 5'-AMP mehr vor. Das deutet auf einen weiteren Abbauvorgang von 5'-AMP hin.

Diskussion

Atmung wird nur bei Hirnschnitten gefunden und kann durch Zugabe von cAMP gesteigert werden.

Glukolyse wird nur bei Schnitten und Suspensionen, nicht aber bei zellfreien Überständen beobachtet.

Bei Schnitten tritt in Gegenwart von 0,5 bis 2 mM cAMP, teilweise auch schon bei 0,1 mM cAMP, regelmässig nach ca. 30 min eine starke Hemmung der Glukolyse ein.

Die Glukolyse läuft in Hirnsuspensionen nur dann ab, wenn mit dem Medium nach LePAGE inkubiert wird. Das ursprünglich von LePAGE angegebene ATP kann nach den Versuchsergebnissen der vorliegenden Arbeit durch cAMP ersetzt werden. Diese Beobachtung steht in Einklang mit Messungen von GREENGARD, wonach die Reaktionsenthalpie der hydrolytischen Spaltung der 3'-Bindung im zyklischen Adenosin-3'.5'-monophosphat 14100 cal. pro Mol beträgt. Hier liegt also eine energiereiche Phosphatbindung vor. Sobald diese Hydrolyse des cAMP, - bei der 5'-AMP entsteht -, stattfindet, wird die glukolysefördernde Wirkung des cAMP aufgehoben. Die Hemmung der Glukolyse ist also durch Spaltung des cAMP bedingt.

Der Abbau von cAMP zu 5'-AMP ist durch spezifische Bestimmungen in Proben aus manometrischen Versuchen nachgewiesen worden. Da sich cAMP bei Schnittversuchen bereits nach kurzer Inkubationszeit quantitativ in 5'-AMP umgewandelt hat, lassen sich rechnerisch die bei dieser Reaktion freigesetzten H^+-Ionen in Beziehung setzen zu der wirklich gemes-

senen H^+-Bildung. Bei diesem Vergleich ergibt sich, dass nur selten die theoretisch zu erwartende Menge H^+ (CO_2-Freisetzung in bikarbonathaltiger Lösung) gebildet wird.
Eine Erklärung für das H^+-Defizit könnte darin bestehen, dass bei dem in dieser Arbeit nachgewiesenen weiteren Abbau des 5'-AMP alkalisch reagierende Gruppen frei werden, die in der Lage sind, H^+-Ionen zu binden.
Der Abbau des cAMP ist von der Struktur des untersuchten Materials abhängig. Er läuft am schnellsten in Gegenwart von Schnitten ab und ist in zellfreien Überständen am langsamsten. In Suspensionen mit mittlerer Spaltungsgeschwindigkeit von cAMP hält daher auch die Glukolyse länger als bei Schnitten an. Sobald sich ausreichende Mengen von 5'-AMP gebildet haben, findet keine Glukolyse mehr statt.
Durch Erhöhung der Glukosekonzentration auf 4mg/ml wird die Glukolysehemmung nach Zugabe von cAMP in einigen Versuchen verzögert oder verringert. Dieser Effekt ist aber nicht regelmäßig reproduzierbar. Vermutlich sind diese unterschiedlichen Versuchsergebnisse auf verschiedene Spaltungsgeschwindigkeiten von cAMP zurückzuführen.

Zusammenfassung

In Gegenwart von cAMP wird an Schnitten, zellfreien Überständen und Suspensionen aus Kaninchenhirn Atmung und aerobe Glukolyse (bei Suspensionen auch die anaerobe Glukolyse) manometrisch gemessen.

Nach den Versuchen werden in den Inkubationslösungen Glukose, Laktat, Pyruvat und 5'-AMP bestimmt.

Die Atmung der Schnitte wird durch cAMP stimuliert.

Die unmittelbar nach Zugabe von cAMP gesteigerte Säurebildung beruht nur zum Teil auf der Bildung von Milchsäure. Ein wesentlicher Anteil der H^+-Ionen entsteht bei der hydrolytischen Umwandlung von cAMP in 5'-AMP.

Die ungefähr 30 min nach Zugabe von cAMP einsetzende Hemmung der Glukolyse der Schnitte beruht auf der Gegenwart von 5'-AMP, das sich aus cAMP gebildet hat.

In zellfreien Überständen wird in Gegenwart von cAMP weder Glukolyse noch Lipolyse gefunden. Die Säurebildung beruht hier allein auf der Bildung von H^+ bei der Umwandlung von cAMP in 5'-AMP. Diese Umwandlung findet allerdings wesentlich langsamer statt als in Gegenwart von Schnitten.

In Suspensionen aus Kaninchenhirn läuft eine Glukolyse nur dann ab, wenn der Lösung das Inkubationsmedium nach LePAGE zugesetzt wird. Das Adenosintriphosphat dieses Mediums kann durch zyklisches Adenosinmonophosphat ersetzt werden. Die Wirkungen von ATP und cAMP sind quantitativ etwa gleich, doch tritt maximale Wirkung bereits ca. 20 min nach Zugabe von ATP, jedoch erst ca. 40 min nach Zugabe von cAMP ein.

Spaltung von cAMP zu 5'-AMP tritt auch in Gegenwart von Suspensionen auf. Die Spaltungsgeschwindigkeit ist jedoch langsamer als bei Schnitten und schneller als bei zellfreien Überständen.

SCHRIFTTUMSVERZEICHNIS

1. BERGMEYER, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim 1970.

2. BEWSHER, P.D., and ASHMORE, J.: Ketogenic and lipolytic effects of glucagon on liver. Biochem. Biophys.Res.Commun. 24 (1966): 431-436.

3. BLECHER, M.: Evidence for involvement of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in glucose utilization by isolated rat epididymal fat cells. Biochem.Biophys.Res.Commun. 27 (1967): 560-567.

4. BOEHRINGER Mannheim GmbH.: Arbeitsanleitungen für UV-Test-Kombinationen.
5.Auflage Juni 1968 (Glukose)
4.Auflage 1969 (Laktat)
4.Auflage 1967 (Pyruvat)
1.Auflage 1970 (Neutralfette und Glyzerin)
5.Auflage 1970 (AMP/ADP).

5. BROWN, E., CLARKE, D.L., ROUX, U., and SHERMAN, G.: The stimulation of adenosine-3', 5'-monophosphate production by antidiuretic factors. J.Biol. Chem. 238 (1963): 852-853.

6. BUTCHER, R.W.: Cyclic 3',5'-AMP and the lipolytic effects of hormones on adipose tissue. Pharmacol.Rev. 18 (1966): 237-241.

7. BUTCHER,R.W., ROBISON, G.A., HARDMAN,J.G., and SUTHERLAND,E.W.: The role of cyclic AMP in hormone actions. Advances in enzyme regulation 6 (1968): 1.

8. BUTCHER,R.W., SNEYDT,J. G.T.,PARK,C.R., and SUTHERLAND,E.W.: Effect of insulin on adenosine-3',5'-monophosphate in the rat epididymal fat pat. J.Biol.Chem. 241 (1966): 1651-1653.

9. DITTMANN,J., and HERRMANN,H.D.: An action of adenosine 3',5'-monophosphate on flucose metabolism of rabbit brain slices. Experientia 26 (1970): 133.

10. EXTON,J.H., and PARK,C.R.: The stimulation of gluconeogenesis from lactate by epinephrine, glucagon and cyclic 3',5'-adenylate by the perfused rat liver. Pharmacol.Rev. 18 (1966): 181-188.

11. GILMAN,A.G., and RALL,T.W.: Studies on the relation of cyclic 3',5'-AMP to TSH action in beef thyreoid slices. Fed.Proc. 25 (1966): 617.

12. GREENGARD,P., RUDOLPH, ST.A., and STURTEVANT, J.M.: Enthalpy of hydrolysis of the 3'bond of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate. J.Biol.Chem. 244 (1969): 4798-4800.

13. HAYNES,R.C., SUTHERLAND,E.W., and RALL,T.W.: The role of cyclic adenylic acid in hormone action. Recent Progress in Hormone Res. 16 (1960): 121-128.

14. KAKAUCHI,S., RALL,T.W., and McILWAIN,H.: The effect of electrical stimulation upon the accumulation of adenosine 3',5'-phosphate in isolated cerebral tissue. J.Neurochem. 16 (1969): 485-491.

15. KLAINER,L.M., CHI, Y.-M., FREIDBERG,S.L., RALL,T.W., and SUTHERLAND,E.W.: Adenyl Cyclase. IV. The effects of neurohormones on the formation of adenosine 3',5'-phosphate by preparations from brain and other tissues. J.Biol.Chem. 237 (1962): 1239-1243.

16. LUDT,H. und DITTMANN,J.: Vereinfachte Ausrechnung von Warburg-Versuchen nach der Zwei-Gefäss-Methode mit einem programmierten Rechner. Z.Klin.Chem.u.Klin.Biochem. 8. (1970): 656-657.

17. LUDT,H. und DITTMANN,J.: Rechnerische und graphische Auswertung von manometrischen Stoffwechselmessungen mit einer elektronischen Rechenanlage. Z. med. Labortechnik 13 (1972): 79-84.

18. MARSH,J.M., BUTCHER, R.W., SAVARD,K., and SUTHERLAND,E.W.: The stimulatory effect of luteinizing hormone on adenosine-3',5'-phosphate accumulation in corpus luteum slices. J.Biol.Chem. 241 (1966): 5436-544

19. McILWAIN,H.: Biochemistry and the Central Nervous System. J.&A. Churchill Ltd., London W.1. 3 (1966): 80.

20. MIYAMOTO,E., KUO,J.F., and GREENGARD,P.: Adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinase from brain. Science 165 (1969): 63-65.

21. MURAD,F., CHI,Y.M., RALL,T.W., and SUTHERLAND,E.W.: Adenyl cyclase III. The effect of catecholamines and choline esters on the formation of adenosine-3',5'-phosphate by preparation from cardiac muscle and liver. J.Biol.Chem. 237 (1962): 1233-1238.

22. ORLOFF,J., and HANDLER,J.: The role of adenosine 3',5'-phosphate in the action of antidiuretic hormone. Am.J.Med. 42 (1967): 757-768.

23. RALL,T.W., and SUTHERLAND,E.W.: The regulatory role of adenosine-3',5'-phosphate. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 26 (1961): 347-354.

24. ROBISON,G.A., BUTCHER,R.W., and SUTHERLAND,E.W.: Adenyl cyclase as an adrenergic receptor. Ann.N.Y.Acad.Sci. 139 (1967): 703-723,

25. SUTHERLAND,E.W., and RALL,T.W.: The relation of adenosine-3',5'-phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones. Pharmacol. Rev. 12 (1960): 265-299.

26. WELLER,M., and RODNIGHT,R.: Stimulation by cyclic AMP of intrinsic protein kinase acitivity in ox brain membrane preparations. Nature 225 (1970): 187-188.

27. WARBURG,O.: Neue manometrische Zweigefäßmethode. Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 348 (1967): 1677-1682.

28. WARBURG,O.: Weiterentwicklung der zellphysiologischen Methoden. Z. klin.Chem. 1 (1963): 33-37.

29. WARBURG,O.: Weiterentwicklung der zellphysiologischen Methoden und Anwendung auf Krebs und Photosynthese. Verlag G. Thieme,Stuttgart, Interscience Publ., New York, 1962.

30. WARBURG,O.: Wasserübertragende Fermente. Verlag Dr.W.Saenger,Berlin 1948.

31. WARBURG,O., GEISSLER,A.W. and LORENZ,S.: CO_2-Drucke über Bicarbonat-Carbonat-gemischen. Z. Naturforschg. 16b (1961): 283.

32. WARBURG,O. und KRIPPAHL,G.: Züchtung von Chlorella mit der Xenon-Hochdrucklampe. Z. Naturforschg. 17b (1962): 631.

D A N K S A G U N G

Herrn Prof.Dr. F. L O E W danke ich für die freundliche Überlassung des Themas zur vorliegenden Dissertation und für die Möglichkeit, die hierfür notwendigen Arbeiten im Laboratorium der Neurochirurgischen Universitätsklinik durchführen zu können.

Ebenso danke ich Herrn Dr. DITTMANN für die Ratschläge bei der Fertigstellung und statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse.

L E B E N S L A U F

Am 17. Dezember 1946 wurde ich als Sohn des Dr.med.vet. und heutigen Veterinärdirektors i.R. Hubert Wilmes und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Bonsmann, in Siegen geboren. Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in Geisweid/Krs. Siegen besuchte ich von 1957 bis 1966 das Fürst-Johann-Moritz-Gymnasium in Weidenau/Sieg. Nach einem Semester Veterinärmedizin in Giessen studierte ich Medizin an den Universitäten Saarbrücken, Heidelberg und München. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im April 1969 in Homburg/Saar und das Staatsexamen 1972 ebenfalls in Homburg.